

# 化粧品の新しい経皮吸収研究の展望

—化粧品の経皮吸収および皮膚中濃度の評価は如何にあるべきか—

杉林 堅次 押坂 勇志 藤堂 浩明

## 化粧品の新しい経皮吸収研究の展望

—化粧品の経皮吸収および皮膚中濃度の評価は如何にあるべきか—

杉林 堅次<sup>\*1</sup> 押坂 勇志<sup>\*2</sup> 藤堂 浩明<sup>\*3</sup>

**Abstract** : Skin permeation experiments have been broadly done since 1970s to 80s as an evaluation method for transdermal drug delivery systems. In cosmetic formulations, skin concentration of active ingredients is more important than their skin permeation, because primary target site of the active ingredients is skin surface or skin tissues. Nevertheless, little investigation was carried out on the test method of skin concentration after application of cosmetic formulations. Recently we investigated an estimating method of skin concentration of the chemical compounds from their skin permeation profiles. In the study, we took care of "3Rs" issues for animal experiments. We have proposed an equation which was capable to estimate animal or human skin concentration from permeation profile through the artificial membrane (silicone membrane) and animal skin. The silicone membrane was found to be useful as an alternative membrane to human or animal skin for predicting human skin concentration of chemical compounds, because an extremely excellent extrapolation to animal or human skin concentration was attained by calculation using the silicone membrane permeation data. We review present our paper and relative studies.

**Key words** : hairless rat skin, silicone membrane, membrane permeation, skin concentration, paraben

## 1. はじめに

有効成分の皮膚透過性（経皮吸収性）試験は、とくに主薬の全身吸収を目的とした医療外用剤（Transdermal Drug Delivery Systems. TDDS または TTS と略されている）の評価方法として 1970 または 80 年代から行われてきた。しかし、化粧品には製剤自体が有効であり有効成分を持たないもの多く、これらでは皮膚透過性（経皮吸収

性）試験が無意味である。また、有効成分を持っているものでも、これら化粧品の主な作用部位は、皮膚局所および皮膚表面である。そのため、皮膚局所の効果や安全性を評価するには、有効成分の皮膚透過性（経皮吸収性）ではなく、むしろ皮膚中濃度が重要となる。

一方、局所作用型医療外用剤の開発では、ヒト皮膚中濃度の評価が必要であるが、ヒト皮膚中濃度の評価の前に動物実験が行なわれている。読

"Foresight into a new transdermal absorption study of cosmetics : How to evaluate transdermal absorption and skin concentration of cosmetics?"

<sup>\*1</sup> Kenji Sugibayashi, <sup>\*2</sup> Takeshi Oshizaka, <sup>\*3</sup> Hiroaki Toudou (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座—350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1)

<sup>\*1</sup> (写真左) 1985 年城西大学薬学部講師, 89 年同助教授, 98 年同教授。現在、城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座教授, 薬学部長, 生命科学研究センター所長。日本化粧品学会理事, 日本実験動物代替法学会理事, 他。

<sup>\*2</sup> (写真中央) 2008 年, 城西大学卒業, 2008 年 4 月～2010 年 3 月城西大学修士課程, 薬剤師。

<sup>\*3</sup> (写真右) 1999 年名城大学卒業, 2004 年名城大学博士課程修了, 2004 年 4 月城西大学薬学部助手, 2009 年 4 月城西大学薬学部助教, 薬学博士。



者の方がよくご存じのように、化粧品の開発では、動物福祉の観点から「reduction: 実験動物の削減, refinement: 実験動物の痛みの軽減, replacement: 実験動物の置き換え」という 3Rs の徹底や、さらに EU 諸国で 2009 年 3 月 11 日から施行された動物実験を行った化粧品の輸入・販売禁止等により動物実験ができない環境になっている。したがって、動物実験に頼らず、今後どのように安全でかつより効果的な化粧品を提供していくかが主要な問題になってきている。現在、皮膚透過性試験、皮膚刺激性試験、皮膚感作性試験、の代替品として、三次元培養ヒト皮膚モデルが注目を集めている。また、眼刺激性試験、光関連毒性試験および遺伝毒性試験などでも、様々な実験動物代替法が検討されている。しかし、化粧品有効成分の皮膚中濃度試験の代替法については全く検討されていない。

最近、我々は人工膜であるシリコン膜を用いて、物質透過性を評価した。実験のスキームを図 1 に示す。すなわち、まず①シリコン膜透過挙動からシリコン膜中濃度の予測ができるか調べた。次に、②動物皮膚についても同様に透過性から膜中濃度が予測できるか調べた。さらに、③シリコン膜透過挙動から動物またはヒト皮膚中濃度の推定方法について検討した。すなわち、経皮吸収速度ではなく皮膚中濃度を如何に予測していくか、また、動物実験代替法を用いて如何に皮膚中濃度を予測するかについて検討した。本稿では、われわれが最近検討した結果<sup>1)</sup>を中心に述べる。

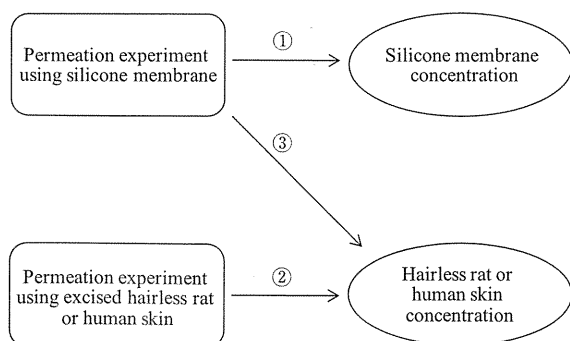


図 1 膜透過性から膜中濃度を予測するための実験スキーム

## 2. 拡散モデルを用いた皮膚中濃度の理論的解釈

### 2-1. 均一 1 層膜モデルの利用

通例、化粧品や医薬品外用剤を適用した後の有効成分の皮膚中濃度の決定には 1 回の皮膚透過から 1 つの皮膚中濃度データしか得られないため、動物実験では多くの個体数が必要となる。一方、皮膚透過や皮膚中濃度の経時的变化の多くは皮膚バリアーを拡散層とした Fick の拡散則で説明が可能である。したがって、皮膚透過性から数学的手法を用いて皮膚中濃度の決定ができるはずである。さらに、よりつきつめてみると、このような皮膚中の拡散挙動はシリコン膜などを用いても表現できるはずである。

そこで、まず資源や労力を削減するという目的から、シリコン膜についても同様に数学的手法を用いて膜中濃度の決定ができるかどうか評価した。なお、モデル膜はシリコン膜に限ったことではない。極端なことを言えば、いわゆる溶解・拡散膜<sup>2)3)</sup>ならどのような膜でも使用できると思う。

皮膚やシリコン膜を均一な 1 層膜と仮定すると、物質の膜中拡散性は、次式に示す Fick の拡散第 2 法則で表すことができる。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (1)$$

ここで、 $C$  は膜の位置  $x$ 、時間  $t$  における物質濃度である。以下の初期条件 (I.C.) と境界条件 (B.C.) (2) を用いる (図 2 a 参照) と、

$$\begin{aligned} \text{I.C. } t = 0 \quad 0 < x < L_s \quad C = 0 \\ \text{B.C. } t > 0 \quad x = 0 \quad C = KC_v \\ \quad \quad \quad x = L_s \quad C = 0 \end{aligned} \quad (2)$$

$C$  は次式で表すことができる。ここで、 $L_s$  は膜の厚さ、 $K$  は膜 / 基剤間の分配係数、 $C_v$  は基剤中薬物濃度を示す。

$$C = KC_v \left\{ \left( 1 - \frac{x}{L_s} \right) - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \sin \frac{n\pi x}{L_s} \exp \left( -\frac{Dn^2\pi^2}{L_s^2} t \right) \right\} \quad (3)$$

また、無限時間がすぎ、定常状態を迎えたときの膜中濃度  $C_{ss}$  は次式で表すことができる。なお、このときの1層膜とその境界相を含めた concentration-distance profile を図2aに示す。

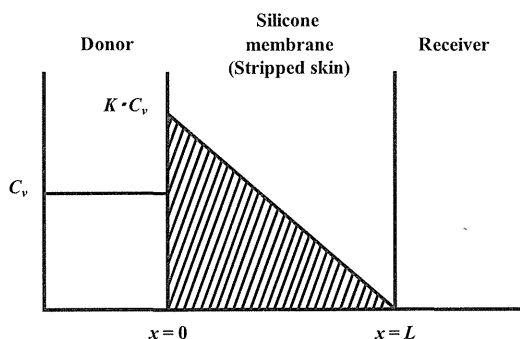
$$C_{ss} = KC_v \left( 1 - \frac{x}{L_s} \right) \quad (4)$$

さらに、膜中平均濃度は(3)式を  $x$  に関して膜の厚  $0$  から  $L_s$  まで積分して、次式で表すことができる。

$$\bar{C}_{ss} = \frac{KC_v}{2} \left\{ 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{m=1}^{\infty} \frac{1}{(2m-1)^2} \exp \left( -\frac{D(2m-1)^2 \pi^2 t}{L_s^2} \right) \right\} \quad (5)$$

(5)式も同様に定常状態を迎えると、次式で表すことができる<sup>1)</sup>。

#### a) One-layered diffusion model



#### b) Two-layered diffusion model

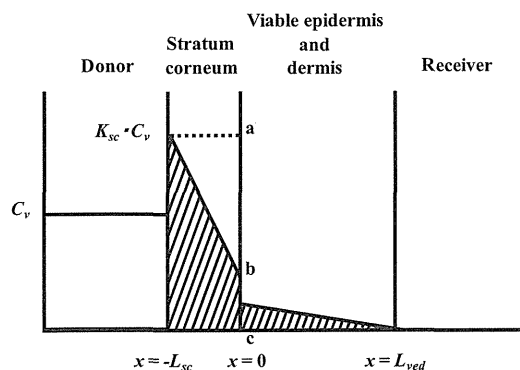


図2 1層膜および2層膜拡散モデルにおける concentration-distance プロフィール

$$\bar{C}_{ss} = \frac{KC_v}{2} \quad (6)$$

(6)式から明らかなように、定常状態での膜中平均濃度は  $D$  ではなく、 $C_v$  と  $K$  で決定される。ここで、 $C_v$  は既知の値であるため、基剤から膜バリアーへの分配係数  $K$  さえわかれば膜中濃度を予測することが可能である。このことは、非常に主要な意味を持っている。例えば、吸収促進剤を用いて膜透過性を増加させても、この吸収促進剤の寄与が膜中の拡散係数  $D$  の上昇であったなら、皮膚中濃度は変わらないということである。すなわち、皮膚中濃度を上昇させるためには分配係数  $K$  を上げなければならない。

#### 2-2. 2層膜モデルの利用

1層膜モデルは取り扱いが極めて簡単で、定常状態時の膜中平均濃度を簡潔な式((6)式)で示すことができる。しかし、皮膚は複雑な拡散膜で、透過性はともかく皮膚中濃度評価では1層膜では不十分であることが多い。すなわち、ヒト皮膚や動物皮膚は透過性(拡散性)の違いから角層と生きた表皮・真皮(viable epidermis and dermis)に分けることが推奨される。一般に、化合物の最大のバリアーとなるのは角層で、この角層は親油性の膜とすることができる。一方、角層下の生きた表皮と真皮は親水性の膜と考えられる。この2層膜モデルは図2bのように示すことができる。

2層膜拡散モデルにおいては、全体の透過係数  $P_{tot}$  は角層の透過係数  $P_{sc}$  と生きた表皮・真皮の透過係数  $P_{ved}$  を用いて以下のように示される。

$$\frac{1}{P_{tot}} = \frac{1}{P_{sc}} + \frac{1}{P_{ved}} \quad (7)$$

また、これら透過係数の逆数  $1/P_{tot}$ ,  $1/P_{sc}$ ,  $1/P_{ved}$  は透過抵抗  $R_{tot}$ ,  $R_{sc}$ ,  $R_{ved}$  となるので

$$R_{tot} = R_{sc} + R_{ved} \quad (8)$$

となる。さらに、図2bのscとved界面でのpoint a,b,cにおいて、abとbcの比は  $R_{sc}$  と  $R_{ved}$  の比で示されることになる。すなわちpoint bでの薬物濃度は次式で表すことができる。

$$C_b = K_{sc} C_v \frac{R_{ved}}{R_{tot}} \quad (9)$$

(9)式を用いることにより、単位面積あたりの角層中の薬物量  $M_{sc}$  は次式のように表すことができる。

$$M_{sc} = \frac{K_{sc} C_v L_{sc} \left(1 + \frac{R_{ved}}{R_{tot}}\right)}{2} \quad (10)$$

また、角層から表皮・真皮への分配係数は  $K_{sc}$  と  $K_{ved}$  の定義から  $K_{ved}/K_{sc}$  と表すことができる。したがって、単位面積当たりの生きた表皮と真皮(ved)中の薬物  $M_{ved}$  は次式のように表すことができる。

$$M_{ved} = \frac{K_{ved} C_v L_{ved} \frac{R_{ved}}{R_{tot}}}{2} \quad (11)$$

最終的に単位面積あたりの皮膚中の薬物量  $M_{tot}$  は次のように示すことができる。

$$M_{tot} = \frac{C_v}{2} \left\{ K_{sc} L_{sc} \left(1 + \frac{R_{ved}}{R_{tot}}\right) + K_{ved} L_{ved} \frac{R_{ved}}{R_{tot}} \right\} \quad (12)$$

(12)式を皮膚の厚さ ( $L_{tot}$ ) で除し、さらに  $R$  を透過係数  $P$  で示すと、定常状態時の皮膚中濃度は、

$$\bar{C}_{ss} = \frac{C_v}{2L_{tot}} \left\{ K_{sc} L_{sc} \left(1 + \frac{P_{tot}}{P_{ved}}\right) + K_{ved} L_{ved} \frac{P_{tot}}{P_{ved}} \right\} \quad (13)$$

となる<sup>1)</sup>。以上より、分配係数  $K$ 、透過係数  $P$  を full-thickness skin と stripped skin 透過実験から求めれば、皮膚中濃度を予測することが可能となる。

### 3. シリコン膜透過性からシリコン膜中濃度の予測

上記理論の妥当性を確認するため、アルキル鎖の異なるパラベン類（メチルパラベン：MP、エチルパラベン：EP、プロピルパラベン：PP、ブチルパラベン：BP）の水溶液または水懸濁液を用いて、シリコン膜透過性を測定した。また、透過実験後にパラベン類のシリコン膜中濃度を測定した。

図3aにパラベン類の累積シリコン膜透過量を示す。なお、それぞれのパラベンで適用濃度が異なったため、図の縦軸は実際の透過量を適用濃度で除した normalized data を示す。図より、BPの透過量が最も高く、続いてPP、EP、そしてMPとなり、脂溶性が高くなるに従って高い透過性を示すことが確認された。また、膜バリアーとの溶解度パラメータの差が小さい物質ほど、透過速度が高くなることから、今回用いた一連のパラ

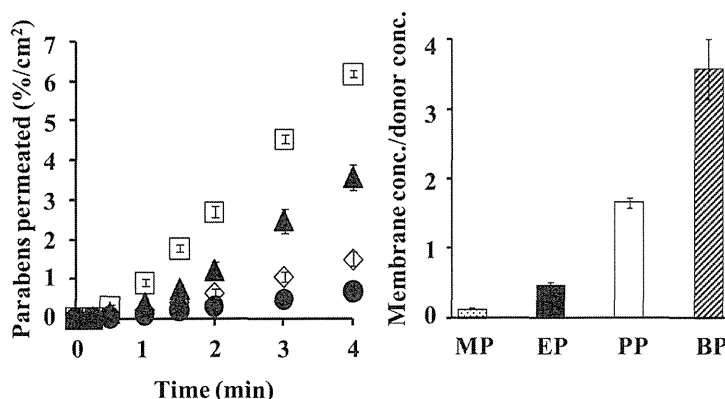


図3 各種パラベンの累積シリコン膜透過量 (a) (● : 10mM MP, ◇ : 5mM EP, ▲ : 1mM PP, □ : 0.5mM BP) とシリコン膜中濃度 (b) (mean ± S.E. n = 4~8)

ベン類の中では、BPの溶解度パラメータがシリコン膜の溶解度パラメータ  $\langle 7.3 \sim 7.5 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2} \rangle$  に最も近いと考えられた。また、通常、 $K_{o/w}$  が大きくなるにつれて溶解度パラメータは小さくなる。すなわち、MPの溶解度パラメータは  $12.0 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2}$  と今回用いたパラベン類の中では最も大きく、続いてEP  $11.5 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2}$ 、PP  $10.9 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2}$ 、そしてBP  $10.6 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2}$  の順である。図3bは、パラベン類の透過実験後の適用濃度で補正した膜中濃度の normalized data

を示す。パラベン類の  $K_{o/w}$  が高くなるにつれて、適用濃度に対する膜中濃度の割合が増加した。

図4にシリコン膜透過性を1層膜モデルで解析して得られたシリコン膜中濃度の理論値((6)式で求められる)と実測値(normalized value)の関係を示す。図から明らかなようにシリコン膜のような均一な1層膜では、(6)式から決定した理論値と実測値で1対1の相関が得られることが明らかとなった。よって、シリコン膜中濃度はシリコン膜透過性から予測することが可能であると示唆された。すなわち、図1の①は可能という結果が得られた。

#### 4. 皮膚透過性から皮膚中濃度の予測

ヘアレスラットを実験動物として用いた。また、皮膚中濃度の推定についてもシリコン膜中濃度の推定時と同様に一連のパラベン類を用いた。なお、パラベン類はエステル類であるため、皮膚中代謝が容易に引き起こされる。今回は種々脂溶性を示す物質の皮膚中濃度を予測することが目的であるので、皮膚中代謝を無視するためにエステラーゼ阻害剤を用いて検討した。なお、この酵素阻害剤を用いても物質の皮膚透過能に影響しないことは確認している<sup>4)</sup>。

図5aにパラベン類の*in vitro*累積ヘアレスラット皮膚透過量を示す。縦軸は同様にraw dataを適用濃度で除して求めたnormalized dataを示す。ヘアレスラット皮膚透過挙動は、シリコン膜透

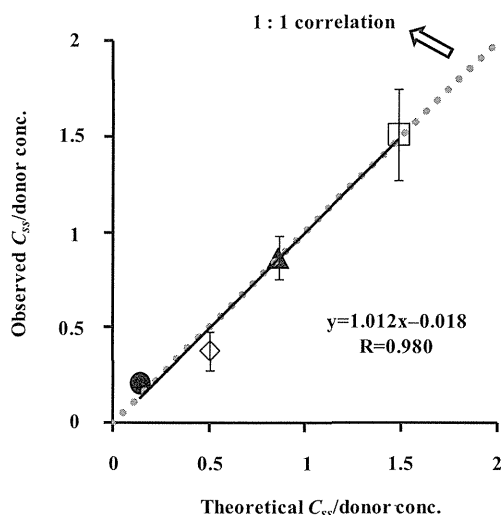


図4 シリコン膜透過性を1層膜解析して得たシリコン膜中濃度の理論値と実測値の関係 (mean  $\pm$  S.D. n = 4~8)

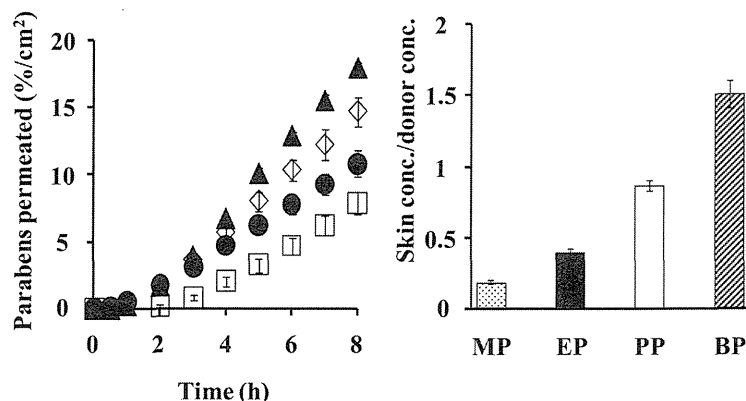


図5 各種パラベンの累積皮膚透過量 (a) (●:10mM MP, ◇:5 mM EP, ▲:1 mM PP, □:0.5mM BP) と皮膚中濃度 (b) (mean  $\pm$  S.E. n = 5~11)

過挙動と類似していたが、シリコン膜透過に比べ、ラット皮膚透過では各パラベン間の累積透過量により大きな差が見られた。これらは、シリコン膜は均一であるのに対し、ラット皮膚は付属器官などがあるため付属器官ルートを介した吸収があるためだと思われる。なお、興味深いことに、シリコン膜透過性ではBPが最も高かったのに対し、ラット皮膚ではBPが最も低い透過性を示した。これは、BPの溶解度パラメータが皮膚バリアー（角層）よりもシリコン膜に近いためだと考えられる。図5bに *in vitro* 皮膚透過実験後

の皮膚中濃度の実測値 (normalized data) を示す。シリコン膜同様、パラベン類の  $K_{o/w}$  が高くなるにつれて適用濃度に対する皮膚中濃度の割合が増加した。しかし、MP 以外のパラベン類では、シリコン膜に対する増加のほうが大きいことが確認された。これは、パラベン類の性質がヘアレスラット皮膚よりもシリコン膜に近いためだと思われる。

次にヘアレスラット皮膚透過性についてもシリコン膜と同様を1層膜モデルで解析して皮膚中濃度を求めた。その結果を図6に示す。この図から明らかなように、理論値と適用濃度で補正した皮膚中濃度の実測値の関係は1対1の相関を示さなかった。しかし、両者で高い相関関係があったことから、パラベン類のように一連の化合物であれば1層膜解析でも皮膚中濃度の実測値を予測できることが示唆された。

図7aには、パラベン類のシリコン膜に対する  $K_{\text{silicone/vehicle}}$  とラット皮膚に対する  $K_{\text{skin/vehicle}}$  の関係を示す。この2つの  $K$  には、比較的良好な相関性があることがわかった。一方、一般に同一物質の同一基剤から異なる2つの膜への分配率  $K$  には以下の関係がある。

$$\log K_{\text{skin/vehicle}} = a \log K_{\text{silicone/vehicle}} + b \quad (14)$$

ここで、 $a$  と  $b$  は係数である。図7bには  $K_{\text{silicone/vehicle}}$  と  $K_{\text{skin/vehicle}}$  の両対数プロットを示す。図から明らかなように、極めて良好な直線関係があるこ

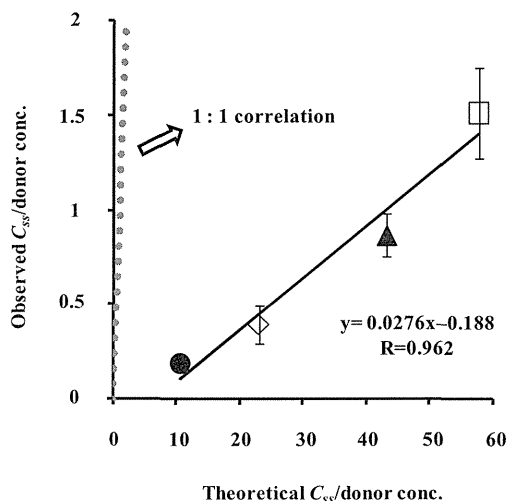


図6 皮膚透過性を1層膜解析して得た皮膚中濃度の理論値と実測値の関係 (mean  $\pm$  S.D.  $n = 5 \sim 11$ )

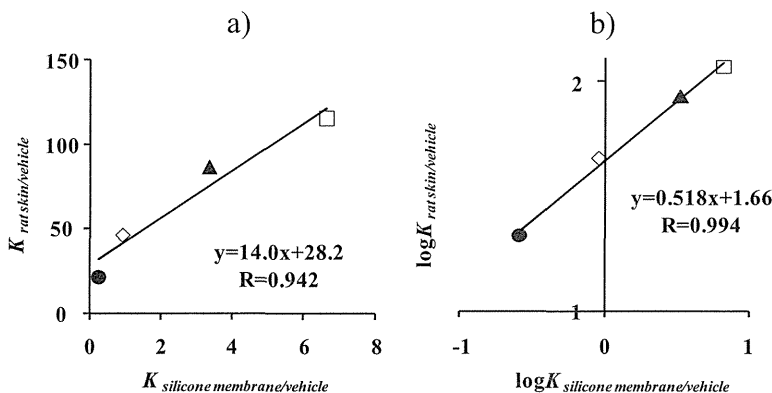


図7 パラベン類のシリコン膜に対する分配係数とラット皮膚に対する分配係数の関係  
(a)  $K_{\text{skin/vehicle}}$  と  $K_{\text{silicone/vehicle}}$  の関係  
(b)  $\log K_{\text{skin/vehicle}}$  と  $\log K_{\text{silicone/vehicle}}$  の関係

とがわかった。1層膜モデルでは、皮膚中濃度を決定づける唯一のパラメータが $K$ であるので、(14)式またはその関係図（たとえば図7b）を用いて $K_{\text{silicone/vehicle}}$ から $K_{\text{skin/vehicle}}$ を予測し、皮膚中濃度が推定できることになる。

次に皮膚透過性を図2bに示した2層膜モデルで解析し、皮膚中濃度を予測することとした。なお、(13)式を見ればわかるように、皮膚中平均濃度の予測には、角層のあるfull-thickness skinを介した透過性測定と角層をはぎ取ったstripped skinを介した透過性測定の両方が必要である。図8には、2層膜モデルを用いて予測した皮膚中濃度の理論値と実測値（normalized data）の関係を示す。理論値と実測値は1対1の相関を得た。このことから、皮膚透過性を2層膜モデルで解析することにより、皮膚中濃度を精度よく予測することが可能であると示唆された。

以上、皮膚のような角層バリアーとそれ以下の生きた表皮と真皮のバリアーからなる皮膚では、2層膜モデルによって膜透過性から膜中濃度を予測することが可能であることが示唆された。ヒト皮膚でもヘアレスラットと同様に予測することができると思われる。我々はすでに三次元培養皮膚透過性でも同様に2層膜モデルで示されることを確認している<sup>5)</sup>。

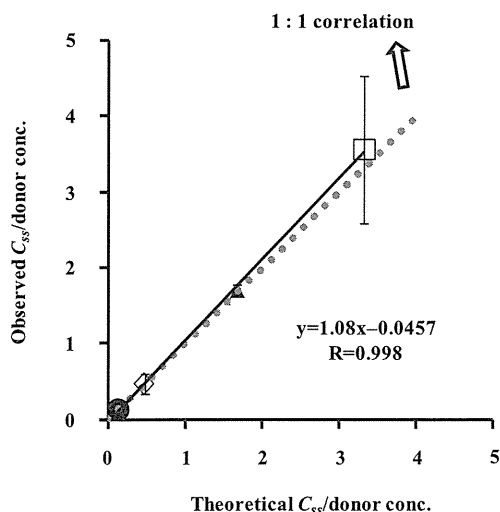


図8 皮膚透過性を2層膜解析して得た皮膚中濃度の理論値と実測値の関係 (mean  $\pm$  S.D. n = 3~8)

## 5. シリコン膜透過性試験はヒト皮膚中濃度を予測する動物実験代替法になりうるか？

図9にシリコン膜透過性から1層膜モデルで予測したシリコン膜中濃度とラットの皮膚中濃度の実測値（normalized data）の関係のプロットを示す。もちろん、1対1の相関は得られなかったものの、両者にかなり厳密な直線関係がみられた。このように、少なくともパラベン類（パラオキシ安息香酸アルキルエステル類）のような一連の化合物では、それらのシリコン膜透過性を測定しておけば、動物やヒト皮膚中濃度を予測することも可能であると思われた。また、(14)式の利用も皮膚中濃度の予測に有用であると思われる。今後は、もっと多くの物質について試験して確認していかねばならないが、シリコン膜などを用いた人工膜透過試験法はヒト皮膚中濃度を予測する動物実験代替法となりうると思われた。

## 6. おわりに

本研究より、シリコン膜透過性から、ラット皮膚中濃度の予測が可能であるならば、ヒト皮膚中濃度の予測も可能となるため、シリコン膜はヒト皮膚代替膜として有用であることが考えられ

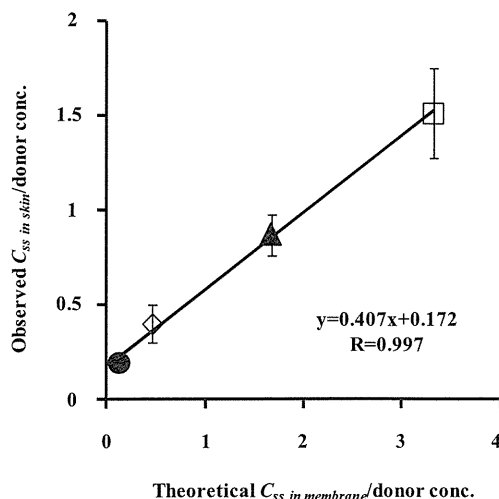


図9 シリコン膜透過性を1層膜解析して得たシリコン膜中濃度の理論値と皮膚中濃度の実測値の関係 (mean  $\pm$  S.D. n = 3~8)



る。膜透過データを拡散則に従い解析することで、シリコーン膜やラット皮膚への分配性や濃度が容易に予測できることが示唆された。このことは、化粧品や医薬品の製剤設計を効率的に進める手段として、膜透過データが有効であることを示している。しかし、前述したように、今回は比較的脂溶性が高く、分子量がほとんど変わらない一連の化合物であるパラベン類をモデル化合物として研究してきたため、今後は、パラベン類とは異なる性質を持つ化合物での検討が必要だと思われる。また、皮膚中で作用する有効成分や薬物の安全性や有効性をさらに詳しく評価するには、皮膚中での作用部位ごとに評価する必要があると考えられる。今後の展開が期待される。

## 参 考 文 献

- 1) Sugibayashi K., Todo H., Oshizaka T., Owada Y., Mathematical model to predict skin concentration of drugs : Toward utilization of silicone membrane to predict skin concentration of drugs as an animal testing alternative, *Pharm Res.*, in press
- 2) 梶本晴彦, 杉林堅次, 森本雍憲, 薬剤学, **55**, 127～133 (1995)
- 3) Hatanaka T., Inuma M., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Chem. Pharm Bull.*, **38**, 3452～3459 (1990)
- 4) Sugibayashi K., Hayashi T., Matsumoto K., Hasegawa T., *Chem. Pharm Bull.*, **19**, 352 ～ 362 (2004)
- 5) Watanabe T., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Itagaki H., Susibayashi K., *Pharm Res.*, **19**, 669～675 (2002)